
RÉGÉNÉRATION IN VITRO DE PINS MARITIMES AGÉS PAR BOURGEONNEMENT ADVENTIF SUR EUPHYLLES

E. DUMAS - O. MONTEUUIS

Class. Oxford : 174.7 - 165

SOMMAIRE

<i>Résumé</i>	44
<i>Summary</i>	44
<i>Zusammenfassung</i>	44
1. introduction	45
2. matériels et méthodes	47
21 - matériel végétal	47
22 - conditions de culture <i>in vitro</i>	47
23 - éléments de méthodologie	48
3. résultats	49
4. discussion	53
5. conclusions et perspectives	55
Bibliographie	56

RÉSUMÉ

Des pousses épiphylls ont été obtenues *in vitro* à partir de bourgeonnement adventif sur euphylls de pins maritimes âgés de 17 ans et préalablement rajeunis. L'induction est réalisée durant 4 semaines sur un milieu de culture contenant 22 μM de BAP et 0,25 μM d'ANA. Les phases ultérieures d'expression et d'allongement se déroulent sur un milieu minéral différent, totalement dépourvu de régulateurs de croissance et en présence de charbon actif.

La méthodologie exposée a permis de régénérer, par le même processus mais de façon plus sporadique, des tigelles néoformées *in vitro* à partir de génotypes âgés de 80 à 100 ans.

Ces premiers résultats prometteurs sont discutés en insistant sur les particularités observées liées à la nature des explants, puis en envisageant leur impact en termes de rajeunissement ontogénique et de clonage conforme.

•

SUMMARY

Epiphyllous shoots were obtained *in vitro* through adventitious budding from euphylls excised from 17 year-old maritime pines previously rejuvenated. Induction occurred after a 4 week culture period on a medium including 22 μM BAP and 0,25 μM NAA. A different mineral medium with activated charcoal but totally lacking growth regulators was used for the subsequent expression and elongation phases.

It was possible using the methodology described to regenerate, although more sporadically, neoformed shoots from 80 to 100 year-old genotypes.

These first promising results are discussed with special attention to the observed particularities related to the nature of the cultivated explants, then considering their implication in terms of ontogenetical rejuvenation and true-to-type cloning.

•

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Adventivknospenbildung auf Euphyllen von vorher ver-jüngten 17 Jahrs alten Seekiefern wurden Blattsprossen *in vitro* erzeugt. Die Induktion erfolgte nach 4-wöchiger Kultur auf einem Medium mit Zusatz von 22 μM BAP und 0,25 μM NAA. Die weiteren Ausdrucks- und Streckungsstadien erfolgten auf einem verschiedenen Mineralmedium ohne jegliche Wachstumsregulatoren, doch mit Aktivkohle.

Mit dem gleichen Vorgang, aber in sporadischer Weise, ermöglichte die beschriebene Methodologie die Regeneration *in vitro* neoseformter Sprossen von 80- bis 100 jährigen Genotypen.

Diese ersten vielversprechenden Ergebnisse werden erörtert, mit besonderem Hinweis auf die beobachteten Merkmale im Zusammenhang mit der Natur des Explantats und ebenfalls in Betracht auf deren Einfluss bezüglich ontogenistischer Verjüngung und artssemässer Klonung.

•

1. introduction

Le bourgeonnement adventif est une technique de multiplication asexuée impliquant la formation de *novo* à partir de(s) cellule(s) compétentes de méristèmes gemmaires superficiels susceptibles d'évoluer ultérieurement en bourgeons, puis pousses feuillées (Bigot 1980; Yeung et al. 1981; Thorpe 1988, Bigot 1990). L'intérêt de ce processus se situe essentiellement à deux niveaux : « rajeunissement » et multiplication végétative.

1. Fondamentalement, il s'agit en effet d'un véritable renouveau ontogénétique débouchant, en fonction de l'âge du génotype originel, sur le concept de « rajeunissement ontogénétique » (Fourret et al. 1989), à l'image du bourgeonnement épiphyllé obtenu à partir d'un *Sequoia sempervirens* de 500 ans (Walker 1986). La démarche expérimentale proposée par Lelu et al. (1987) qui consiste à préconiser le bourgeonnement adventif, ou plus exactement l'induction du phénomène, pour stimuler l'aptitude à l'embryogenèse somatique chez *Picea abies* s'inscrit également dans cette optique.

2. Plus pratiquement, la néoformation de bourgeons peut être considérée comme un procédé de multiplication végétative performant en raison des taux de régénération très élevés dans certains cas (Aitken et al. 1981).

Sur *Pinus pinaster*, espèce résineuse d'une grande importance économique en France, le bourgeonnement adventif a déjà fait l'objet de nombreuses recherches fructueuses, essentiellement à partir d'embryons ou de cotylédons de jeunes germinations (David et David 1977, Rancillac 1979, David et al. 1981). David et al. (1982) obtiennent également des résultats à partir de pseudophylles d'un génotype *in situ* de 10 ans.

La présente note se propose de détailler une méthodologie permettant la régénération par néoformation de bourgeons *in vitro* sur euphylls provenant de clones âgés de 17 ans, voire centenaires.

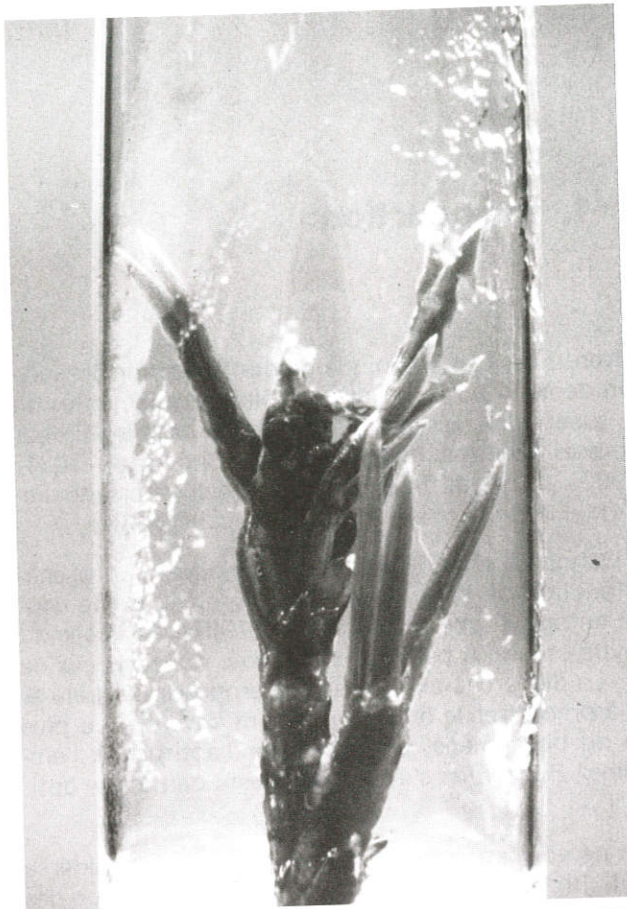


Photo 1 :
Morphologie adulte d'une
microbouture de pin mari-
time de 80 ans en intro-
duction primaire.



Photo 2 :
Microbouture du même
génotype de 80 ans mor-
phologiquement rajeunie
à l'issue d'un régime de
subcultures *in vitro*. Les
euphylls chlorophyllien-
nes caractéristiques des
formes de jeunesse ont
remplacé les pseudophyl-
les portées par les bra-
chyblastes (voir photo 1).

2. matériels et méthodes

21 - MATÉRIEL VÉGÉTAL

Nous avons utilisé comme explants la partie libre — longueur moyenne : 5 à 40 mm par 0,5 mm de largeur environ — d'euphylls chlorophylliennes (Gausсен 1950, de Ferre 1952) prélevées sur des microboutures physiologiquement rajeunies — absence de brachyblastes, morphologie juvénile, (voir photo 2). Ce matériel provient essentiellement d'un génotype de *Pinus pinaster* Ait. âgé de 17 ans. Accessoirement, la technique a été appliquée à d'autres génotypes de même âge et de 80 à 100 ans.

Au moment du prélèvement les microboutures sont cultivées sur le milieu d'allongement décrit par Dumas (1987).

22 - CONDITIONS DE CULTURE IN VITRO

221 - INDUCTION DU BOURGEONNEMENT ADVENTIF

Le traitement inducteur est réalisé en boîtes de Pétri «CML» en polystyrène cristal — 90 x 15 mm — serties à l'aide de Parafilm «M» (American Can Company) et contenant 20 ml d'un milieu de culture de composition suivante : macroéléments de Campbell et Durzan (1975), microéléments de Murashige et Skoog (1962), vitamines de Fossard et al. (1974), BAP : 22 μM , ANA : 0,25 μM , 30 gl^{-1} de saccharose, 8 gl^{-1} d'agar «K267, KADOYA» (Amsterdam bv). Le pH a été ajusté à 5,6 par une solution de KOH (1M) avant autoclavage de 25 min à 118°C. Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont placées durant 4 semaines en lumière continue dispensée par des tubes Sylvania GroLux fournissant une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La température de la salle de culture est maintenue à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

222 - EXPRESSION ET ALLONGEMENT DES BOURGEONS NÉOFORMÉS

Le milieu d'«expression» est constitué des macroéléments de Margara (1977), des microéléments de Murashige et Skoog (1962) dilués de moitié, de 50 mg l^{-1} de myo-inositol, 0,2 mg l^{-1} de thiamine, 0,2 mg l^{-1} de pyridoxine, 20 gl^{-1} de saccharose, 5 gl^{-1} de charbon actif (Merck 2186), et de 8 gl^{-1} d'agar «K267, KADOYA» (Amsterdam bv). Le pH est ajusté dans les mêmes conditions que précédemment, avant addition du charbon actif puis autoclavage de 30 min. à 110°C.

La phase d'expression s'effectue également en boîtes de Pétri (cf. § 221), alors que la phase d'allongement se déroule dans des tubes de culture droits (200 x 25 mm), contenant 20 ml du milieu d'expression et bouchés de façon semi-hermétique (bouchons plastiques Magenta).

Durant la phase d'expression et d'allongement, les cultures sont soumises à un régime photopériodique 16/8 (jours « longs »). L'intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ est fournie par des tubes fluorescents « Cool White ». La température est maintenue à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

23 - ÉLÉMENTS DE MÉTHODOLOGIE

Seules les parties libres des euphylls sont prélevées, sous loupe binoculaire et en conditions aseptiques, pour être placées — à raison de 15 unités en moyenne par boîte de Pétri — en conditions d'induction. Les explants sont positionnés sur la tranche pour favoriser un contact maximal avec le milieu de culture. A l'issue des 4 semaines d'induction, les euphylls sont repiqués toutes les 4 semaines sur le milieu d'expression. Les bourgeons dont la taille atteint 5 mm sont isolés puis transférés en tubes de culture en conditions d'allongement. Leur développement ultérieur s'effectue dans les conditions stipulées par Dumas (1987).

3. résultats

Les relevés effectués après 8 semaines de culture sur milieu d'expression figurent dans le tableau n° 1.

Sur l'ensemble des 4 échantillons-répétitions observés dans le temps, on constate une certaine reproductibilité du pourcentage de réactivité des explants (10 % d'explants réactifs en moyenne).

En revanche, le nombre de bourgeons néoformés par euphyllle varie considérablement au sein, ou entre les différents échantillons. 20 à 30 % de l'effectif total des bourgeons épiphyllés dénombrés mesurent au moins 5 mm et peuvent être isolés sur milieu d'allongement pour évoluer en tigelles (voir photos 6 et 7).

Par ailleurs, la méthodologie décrite a été appliquée avec succès à d'autres génotypes du même âge, voire âgés de 80 à 100 ans après rajeunissement morphologique préalable par microgreffage (Dumas et al., 1989). Dans ce dernier cas, les réponses positives demeurent malgré tout plus sporadiques.

TABLEAU N° 1

Relevés de la réactivité des explants et du nombre de bourgeons néoformés après 8 semaines de culture sur milieu d'expression (génotype de 17 ans)

Échantillons	N. Euph. (1)	N. Euph.R. (2)	% réactivité (3)	N. bg. (4)	N.bg./Euph. R. (5)	C.V. (%) (6)
1	233	19	8 ± 3	39	2,1 ± 0,5	77
2	604	65	11 ± 2	138	2,1 ± 0,2	69
3	520	58	11 ± 3	71	1,2 ± 0,1	45
4	493	51	10 ± 3	120	2,3 ± 0,2	58

(1) : Nombre total d'euphyllés excisés mises en culture sur milieu d'induction.

(2) : Nombre d'euphyllés réactivées — présentant des bourgeons néoformés — sur milieu d'expression.

(3) : % de réactivité : $[(2) / (1)] \times 100$; l'intervalle de confiance est précisé ($p_0 = 5\%$).

(4) : Nombre total de bourgeons néoformés dénombrés.

(5) : Nombre moyen de bourgeons néoformés par euphyllle réactive : $(4) / (2)$; l'intervalle de confiance ($p_0 = 5\%$) est précisé.

(6) : Coefficient de variation du nombre de bourgeons néoformés par euphyllle réactive.

Étapes successives de la régénération d'un pin maritime de 17 ans
par bourgeonnement adventif sur euphylls



Photo 3 : premiers stades de l'expression des structures gemmaires néoformées.

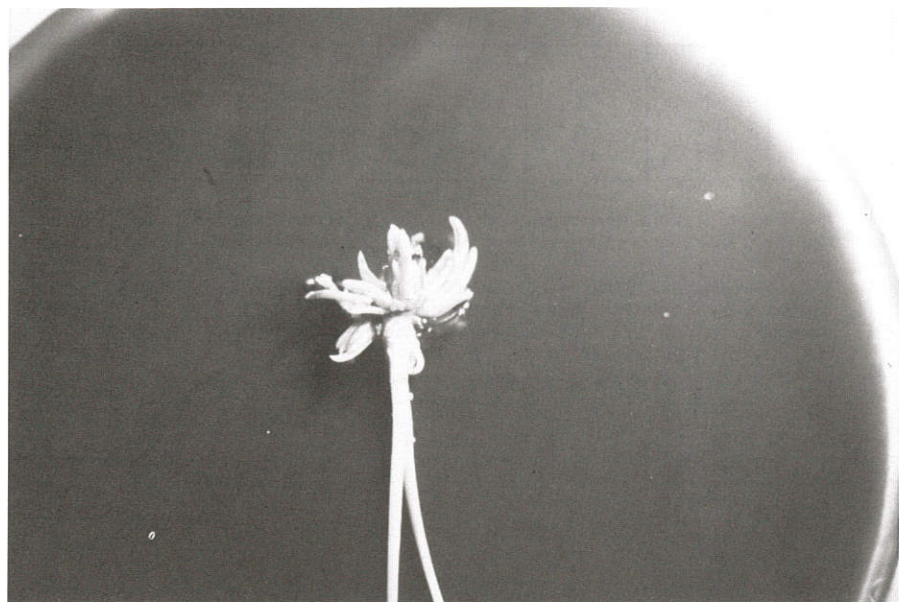


Photo 4 : Allongement des bourgeons adventifs à la base de pseudophylle.

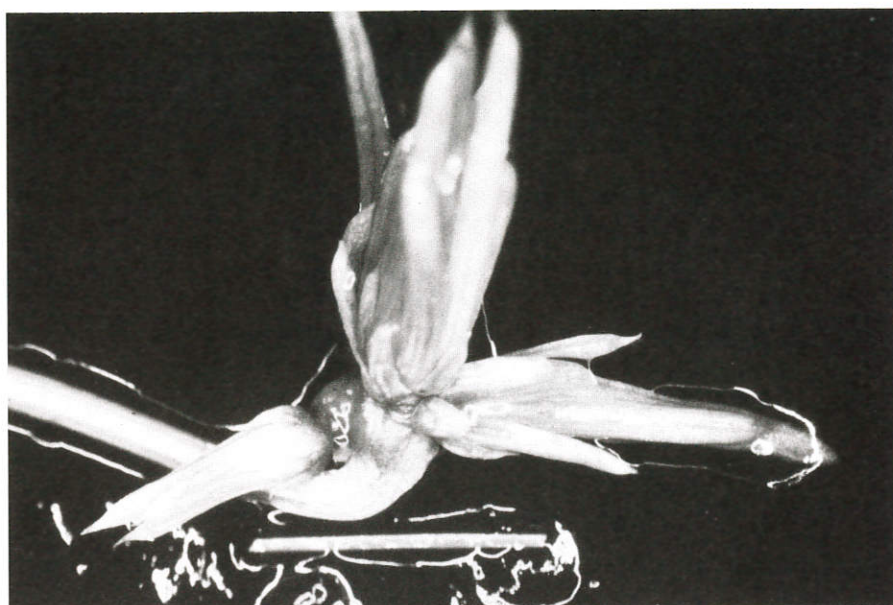


Photo 5 : Allongement des bourgeons adventifs (l'index de référence mesure 10 mm de longueur).

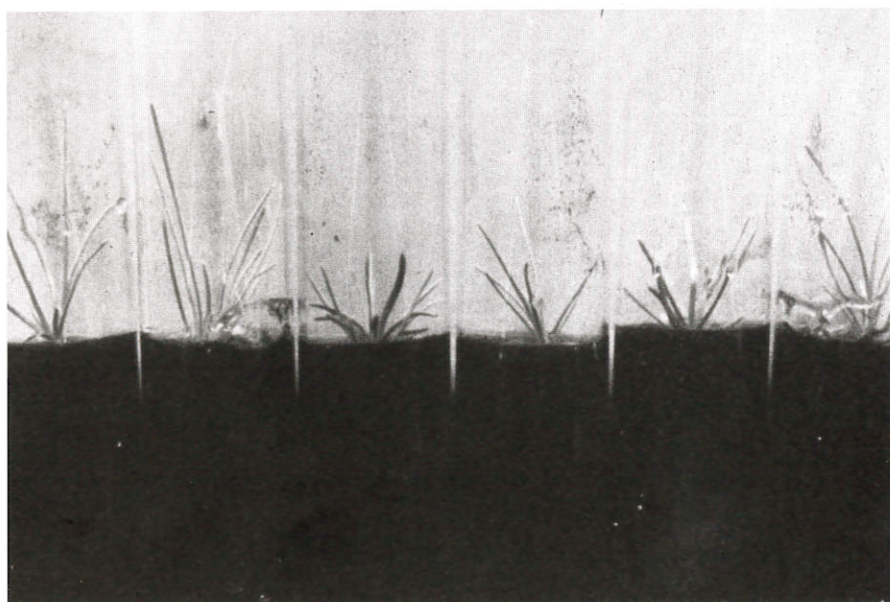
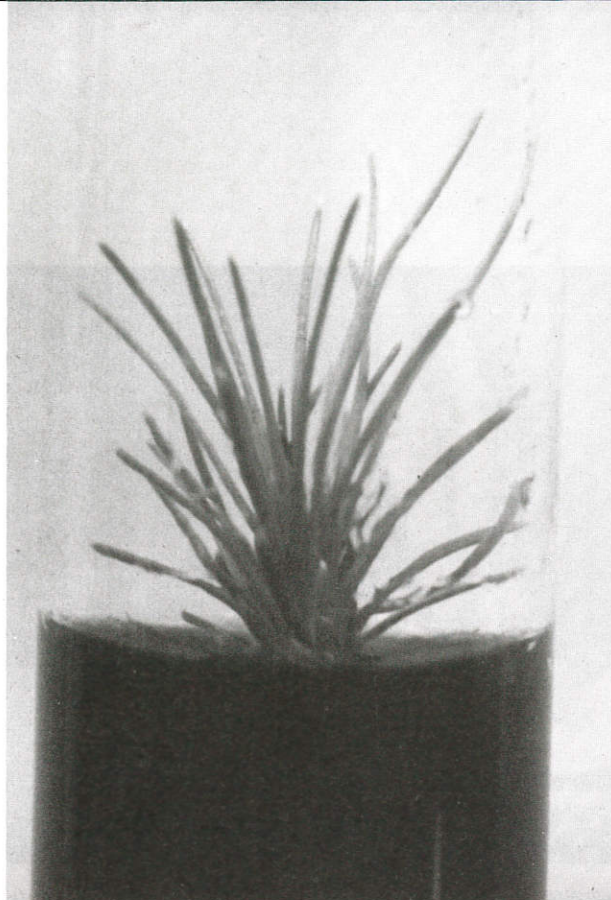
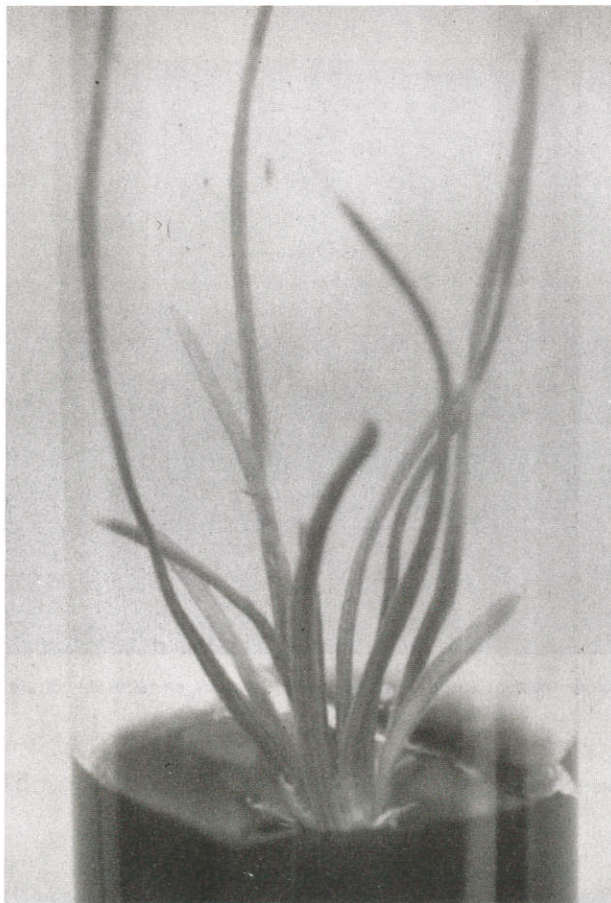


Photo 6 : tiges issues de bourgeonnement adventif, en phase d'élongation, en tubes de culture, après isolement.



Photos 7-8 :
Tigelles issues de bour-
geonnement adventif à
partir d'un génotype de
17 ans (en haut) et cen-
tenaire (en bas).



4. discussion

Contrairement à bon nombre de références bibliographiques, notre travail concerne la néoformation de bourgeons adventifs à partir d'euphylls chlorophylliennes et non de cotylédons. Les euphylls sont des formations foliaires qui, du point de vue ontogénétique, apparaissent plus tardivement que les cotylédons, ou « feuilles embryonnaires » (Gausson 1950, de Ferre 1952). En fait, la nature de l'explant nous a été imposée d'une certaine manière par l'efficacité encore limitée de nos techniques de rajeunissement, ou « retour en arrière », morphologique préalable. En effet, le microgreffage de méristèmes ou les subcultures de matériels provenant de pins maritimes âgés — jusqu'à 80-100 ans — permettent la réversion morphologique du type adulte originel, caractérisé par la présence de brachyblastes porteurs de pseudophylls, vers la production d'euphylls. Celles-ci sont malgré tout bien moins réactives que des cotylédons (David et al. 1981, Dumas, résultats non publiés) ou des embryons (Rancillac 1979), comme en témoignent nos résultats. Sur *Pinus brutia*, Abdullah et al. (1985, 1987) arrivent aux mêmes conclusions. La régénération par néoformation de bourgeons à partir de génotypes âgés peut être également envisagée en prélevant directement sur les sujets *in situ* des organes végétatifs — bourgeons, feuilles — à un certain stade de développement, correspondant selon toute vraisemblance à un état de « compétence physiologique » favorable (Thompson et Zaerr 1981, David et al. 1982, Misson et al. 1982, Arnold 1984, Dunstan et al. 1986, Krogstrup 1987). Nous avons pu vérifier à partir de pseudophylls de pins maritimes âgés de 17 ans que l'obtention de telles structures végétatives à potentialités caulogènes était possible, mais que les cultures initiées sur ces bases périssaient à terme (Dumas, résultats non publiés).

Cette notion évoquée de « compétence physiologique » à la néoformation de bourgeons, apparemment très fugace, pourrait expliquer, à travers l'hypothèse d'inhibitions corrélatives (Bigot 1990), l'hétérogénéité que nous avons constatée entre euphylls de même origine, prélevées dans les mêmes conditions. Une telle variabilité dans les réponses peut être observée à des stades beaucoup plus précoces chez bon nombre de conifères (Cheng 1977, Toivonen et Kartha 1988).

Par ailleurs, les néoformations obtenues sont localisées sur la face adaxiale des explants, à proximité immédiate des zones de blessures occasionnées par l'ablation de la partie libre des euphylls prélevées (voir photos 3 à 5). En ce sens, nos observations présentent de grandes similitudes avec les clichés communiqués par Abdullah et Grace (1987) à partir de feuilles primordiales de *Pinus brutia*. Cette localisation préférentielle a été constatée chez d'autres espèces en fonction de l'âge (Cheng 1977, Patel et al. 1986).

L'hypothèse d'un gradient de substances endogènes favorables décroissant de la partie proximale vers l'extrémité distale peut être retenue (Jansson et Bornman 1980, Bornman 1985), au même titre que la présence de concentrations effectives de BAP à proximité des zones de coupures (Vogelmann et al. 1984, Abdullah et Grace 1987). Conjointement, il serait intéressant d'analyser l'effet de sections ou d'entailles surnuméraires en vue d'accroître la fréquence d'apparition des bourgeons épiphylls et de déterminer l'origine histologique des bourgeons néoformés. Se référant à des travaux connexes, sur pin maritime notamment (David et al. 1981, 1982), nous pouvons toutefois supposer que les cellules subépidermiques des couches superficielles du mésophylle sont plus spécialement impliquées dans le processus.

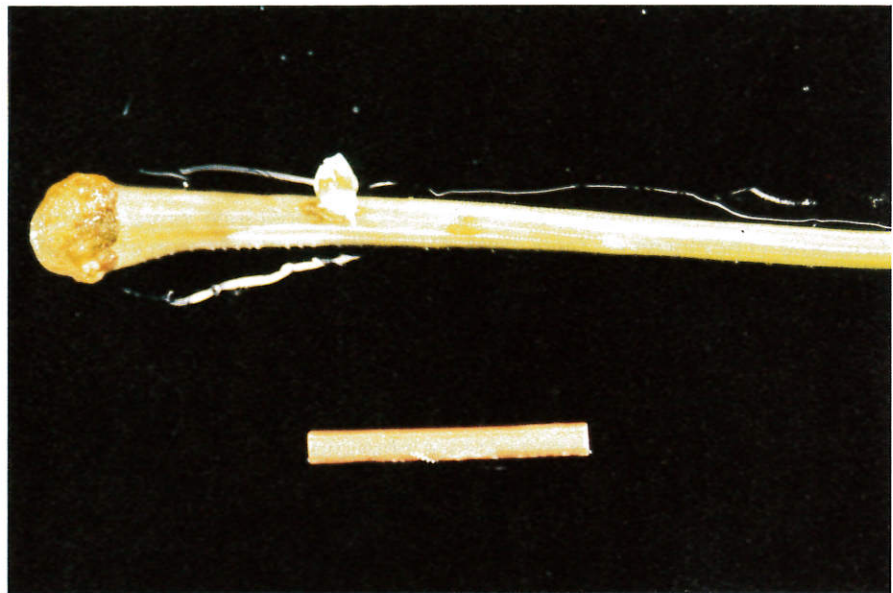


Photo 9 :
Bien qu'apparaissant préférentiellement à proximité de la zone d'ablation de l'euphyll (voir photos 3 à 5), certains bourgeons néoformés se situent sur des portions plus distales (l'index de référence mesure 5 mm de longueur).

5. conclusions et perspectives

La présente note n'a d'autres ambitions que d'attester la possibilité, dans les conditions expérimentales stipulées, de régénérer *in vitro* par bourgeonnement épiphyllé des tigelles de pin maritime âgés à partir d'euphylls chlorophylliennes. Ces premiers résultats paraissent objectivement intéressants et prometteurs dans le cadre des études sur le rajeunissement ontogénétique, au sens littéral du terme. A cette fin, des informations sur le degré de dédifférenciation des cellules originelles impliquées, et une approche cinétique des phases d'induction puis de développement du processus organogène seraient très instructives.

D'un point de vue plus appliqué, il va sans dire que la méthodologie décrite est en tout état de cause perfectible, notamment à travers les modalités du traitement inducteur et l'optimisation des facteurs exogènes. La littérature abonde d'informations dans ces domaines (Bornman 1983, Patel et Thorpe 1984, Flinn et al. 1985, Patel et al. 1986, Perez-Bermudez et Sommer 1987, Thorpe 1988). Par ailleurs, il paraît nécessaire de poursuivre les phases de culture jusqu'à l'enracinement, l'acclimatation et le suivi en conditions naturelles du matériel régénéré, ceci afin d'appréhender les risques de variabilité phénotypique. Conjointement, les progrès réalisés en matière d'investigations biochimiques devraient permettre, dans un avenir proche, de vérifier la conformité génotypique des lignées épiphylls obtenues, à la base de la notion de clonage.

Remerciements :

Les auteurs remercient le Professeur A. David pour la lecture du manuscrit et ses remarques afférentes.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDULLAH A.A., YEOMAN M.M., GRACE J. (1985)
« *In vitro* adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of *Pinus brutia* Ten »
Plant Cell Tissue Organ Culture, 5, 35-44
- ABDULLAH A.A., GRACE J. (1987)
« Regeneration of calabrian pine from juvenile needles »
Plant Science, 53, 147-155
- AITKEN J., HORGAN K.J., THORPE T.A. (1981)
« Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata* »
Can. J. For. Res., 11, 112-117
- ARNOLD S. von (1984)
« Importance of genotype on the potential for *in vitro* adventitious bud production of *Picea abies* »
Forest Sci., 30 (2), 314-318
- BIGOT C. (1980)
« Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques »
Dans : La multiplication végétative des plantes supérieures
Ed. Gauthier - Villars, 133-159
- BIGOT C. (1990)
« Apport de la culture *in vitro* dans le contrôle de la néoformation »
Dans : Cinquantenaire de la culture *in vitro* chez les végétaux, *les Colloques de l'INRA*, Ed. INRA, 51, 37-53
- BORNMAN C.H. (1983)
« Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies in vitro* »
Physiol. Plant., 57, 5-16
- BORNMAN C.H. (1985)
« Hormonal control of growth and differentiation in conifer tissues *in vitro* »
Biologia Plantarum, 27 (4-5), 249-256
- CAMPBELL R.A., DURZAN J.D. (1975)
« Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca* »
Can. J. Bot., 53, 1652-1657
- CHENG T.Y. (1977)
« Factors affecting adventitious bud formation of cotyledon culture of Douglas fir. »
Plant Science Letters, 9, 179-187
- DAVID A., DAVID H. (1977)
« Manifestations de diverses potentialités organogènes d'organes ou de fragments d'organes de Pin maritime (*Pinus pinaster* Sol.) en culture *in vitro* »
C.R. Acad. Sc. Paris, 284, 627-630
- DAVID A., DAVID H., MATEILLE T., JARLET E. (1981)
« Bourgeonnement adventif, *in vitro* sur des cotylédons et aiguilles de Pin maritime »
Annales AFOCEL 1980, 43-55

- DAVID A., DAVID H., MATEILLE T. (1982)
« *In vitro* adventitious budding on *Pinus pinaster* cotyledons and needles »
Physiol. Plant., 56, 102-107
- DUMAS E. (1987)
« Micropropagation d'un clone âgé de Pin maritime en vue de l'obtention de pieds-mères »
Annales AFOCEL 1986, 95-107
- DUMAS E., FRANCKET A., MONTEUUIS O. (1989)
« Microgreffage de méristèmes primaires caulinares de Pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) âgés sur de jeunes semis cultivés *in vitro* »
C.R. Acad. Sc. Paris, 309, 723-728
- DUNSTAN D.I., MOHAMMED G.H., THORPE T.A. (1986)
« Shoot production and elongation on explants from vegetative buds excised from 17 to 20-year-old *Pseudotsuga Menziesii* »
N.Z.J. For. Sci., 16 (3), 269-282
- FERRE Y. de (1952)
« Les formes de jeunesse des Abiétacées. Ontogénie - Phylogénie »
Dans : Tome II Études dendrologiques - Les Gymnospermes - Généralités.
Ed. Lab. For. de Toulouse, 277 p.
- FLINN B.S., WEBB D.T., GEORGIS W. (1986)
« *In vitro* control of caulogenesis by growth regulators and media components in embryonic explants of eastern white pine (*Pinus strobus*) »
Can. J. Bot., 64, 1948 - 1950
- FOSSARD R.A. de, MYINT A., LEE E.C.M. (1974)
« A broad spectrum tissue culture experiments with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pith tissue callus »
Physiol. Plant., 30, 125-130
- FOURET Y., LARRIEU C., ARNAUD Y. (1989)
« Rajeunissement *in vitro* chez le Sequoia sempervirens (Endl) »
Annales AFOCEL 1988, 55-81
- GAUSSEN H. (1950)
« Les Gymnospermes actuelles et fossiles IV »
Ed. Toulouse, Faculté des Sciences, 248 p.
- JANSSON E., BORNMAN C.H. (1980)
« *In vitro* phyllomorphic regeneration of shoot buds and shoots in *Picea abies* »
Physiol. Plant., 49, 105-111
- KROGSTROP P. (1987)
« Formation of adventitious buds in needle primordia isolated from embryonic shoots of adult *Picea abies* »
Biologica Plantarum, 29 (6), 437-444
- LELU M.A., BOULAY M., ARNAUD Y. (1987)
« Obtention de cals embryogènes à partir de cotylédons de *Picea abies* (L) Karst. prélevés sur de jeunes plantes âgées de 3 à 7 jours après germination »
C.R. Acad. Sc. Paris, 305, 105-109
- MARGARA J. (1977)
« La multiplication végétative de la betterave (*Beta vulgaris* L.) en culture *in vitro* »
C.R. Acad. Sc. Paris, 285, 1041-1044

- MISSON J.R., COUMANS M., GIOT-WIRGOT P., GASPAR Th. (1982)
« Induction of adventitious buds on buds of *Picea pungens* grown *in vitro* »
Z. Pflanzenphysiol., **107**, 161-167
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962)
« A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultured »
Physiol. Plant., **15**, 473-497
- PATEL K.R., THORPE T.A. (1984)
« *In vitro* differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex. Loud) »
Plant Cell Tissue Organ Culture, **3**, 131-142
- PATEL K.R., KIM H.R., THORPE T.A. (1986)
« Plantlet formation in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) by tissue culture methods »
Forest Ecology and Management, **15**, 147-160
- PEREZ-BERMUDEZ R., SOMMER H.E. (1987)
« Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliottii* (Engelm.) embryos cultured *in vitro* »
Plant Cell Tissue and Organ Culture, **11**, 25-35
- RANCILLAC M. (1979)
« Mise au point d'une méthode de multiplication végétative *in vitro* du pin maritime (*Pinus pinaster* Sol.) pour la constitution de clones à partir de semences »
Dans : Micropropagation d'arbres forestiers. *Ed. AFOCEL*, 41-48.
- THOMPSON D.G., ZAERR J.B. (1982)
« Induction of adventitious buds on cultured shoot-tips of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb Franco) »
Dans : Coll. Int. Culture *in vitro* des essences forestières.
IUFRO, Ed. AFOCEL, 166-173
- THORPE T.A. (1988)
« Physiology of bud induction in conifers *in vitro* »
Dans : Genetic manipulation of woody plants, *Ed. PLENUM PUBLISHING CORPORATION*, 167-184
- TOIVONEN P.M.A., KARTHA K.K. (1988)
« Regeneration of plantlets from *in vitro* cultured cotyledons of white Spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) »
Plant Cell Reports, **7**, 318-321
- VOGELMANN T.C., BORNMAN C.H., NISSEN P. (1984)
« Update of benzyladenine in explants of *Picea abies* and *Pinus sylvestris* »
Physiol. Plant., **61**, 513-517
- WALKER N. (1986)
« *Sequoia sempervirens* : réjuvenilisation et culture de méristèmes en cascade »
Annales AFOCEL 1985, 25-47
- YEUNG E.C., AITKEN J., BIONDI S., THORPE T.A. (1981)
« Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiata pine »
Bot. Gaz., **142** (4), 494-501